

Министерство здравоохранения Республики Беларусь  
УО «Витебский государственный медицинский университет»  
Научное общество инфекционистов Республики Беларусь  
Ассоциация инфекционистов Санкт-Петербурга и Ленинградской области  
Научное общество инфекционистов Республики Узбекистан  
Санкт-Петербургская научная общественная организация  
«Центр изучения инфекций» ООО «ИНГИЛС»

# **МЕЖДУНАРОДНЫЙ ЕВРО-АЗИАТСКИЙ КОНГРЕСС ПО ИНФЕКЦИОННЫМ БОЛЕЗНЯМ**

**Том 1**

**Актуальные вопросы инфекционной патологии**

Витебск, 5-6 июня 2008 года

# **INTERNATIONAL EURO-ASIAN CONGRESS ON INFECTIOUS DISEASES**

**Volume 1**

**Current problems of infectious pathology**

Vitebsk, June 5-6, 2008

**Материалы  
Евро-Азиатского конгресса по инфекционным болезням**

**УДК** 616-022.7:061.3(4)(5)(081/082)

**ББК** 55.14я431

**С** 23

**Актуальные вопросы инфекционной патологии / Под ред. проф. В.М. Семенова.** — Материалы международного Евро-Азиатского конгресса по инфекционным болезням (Витебск, 5–6 июня 2008 г.). — Витебск, 2008. — 274 с.

В материалах международного Евро-Азиатского конгресса по инфекционным болезням представлены статьи ученых и практических врачей стран Европы и Азии, посвященные ряду актуальных вопросов инфекционной патологии. Тематика представлена всеми направлениями инфектологии (новое в этиологии, эпидемиологии, патогенезе, клинике, диагностике, лечении и профилактике инфекционных болезней), кроме гепатологии (статьи, посвященные проблемам экспериментальной, хирургической и терапевтической гепатологии, включены в состав 2 тома настоящего сборника материалов Евро-Азиатского конгресса). Представленная информация будет полезна широкому кругу врачей-инфекционистов и других медицинских специалистов.

**Редакционная коллегия:**

**Ответственный редактор:** профессор В.М. Семенов (Беларусь)

**Члены редколлегии:** профессор Т.И. Дмитраченко (Беларусь); профессор В.М. Цыркунов (Беларусь); академик РАМН, заслуженный деятель науки РФ, профессор Ю.В. Лобзин (Россия); заслуженный врач РФ, доцент В.М. Волжанин (Россия), профессор М.Д. Ахмедова (Узбекистан), профессор М.А. Андрейчин (Украина), профессор Г.У. Алшинбаева (Казахстан)

**Ответственный секретарь:** доцент И.В. Жильцов (Беларусь)

**Министерство здравоохранения Республики Беларусь**

**УО «Витебский государственный медицинский университет»**

(лицензия ЛИ №232 от 30.04.2004 г.)

210602 г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27

**Материалы участников конгресса размещены по тематическим разделам в алфавитном порядке по фамилии первого автора**



ККУП «Витебский областной центр маркетинга»

210025 г. Витебск, ул. Правды, 32

Ответственная за выпуск — Гречихо О.Т.

Лицензия 02330/0150178 от 13.02.2008 г.

ния антигенной структуры или факторов вирулентности в практических лабораториях классические уропатогенные штаммы *E. coli* O1: K1: H7 принимали за диареогенные эшерихии.

Не отрицая адаптацию к различным макроорганизмам (человек-птица), штаммы *E. coli* O1: K1: H7 имеют одинаковые биологические свойства, в том числе гены, кодирующие факторы вирулентности. В современной научной литературе высказываются предположения, что набор факторов вирулентности у эшерихий этого серовара дает им возможность быть высоко патогенными для птиц (группа АРЕС) и быть потенциальными возбудителями урологических заболеваний человека. Это предположение подтверждено сравнением штаммов различного происхождения на уровне секвенированных геномов. Геномы сравниваемых штаммов имели высокую степень гомологии. Эти исследования показали, что штаммы *E. coli* O1: K1: H7, выделенные от людей с урологическими заболеваниями и от птиц, практически идентичны, включая идентичность факторов вирулентности.

С эпидемиологической точки зрения важна гипотеза о реальном существовании «пищевой цепочки» между «птичьими» — куриными» *E. coli* O1 и *E. coli* O1, вызывающими пиелонефриты у людей. Из этого следует, что уровень заболеваемости ИМВП зависит от контаминации пищевых продуктов животного происхождения штаммами эшерихий, способными длительно персистировать в кишечнике человека и при определенных условиях вызывать заболевания МВП за счет наличия у них специфических факторов вирулентности.

Таким образом при бактериологической диагностике заболеваний различной локализации, вызванных *E. coli* O1, для обоснования истинной этиологической роли клинически значимых штаммов эшерихий целесообразно идентифицировать штаммы до уровня серовара (определять О-, К- и Н- антигены), а также определять ведущие факторы вирулентности.

Следует также создать систему динамического слежения за циркуляцией клинически значимых эшерихий определенных сероваров, общих для человека и животных.

## ПРОЯВЛЕНИЕ ГЕМОЛИТИЧЕСКОЙ И ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГОСПИТАЛЬНЫМИ ШТАММАМИ *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Никандров В.Н.<sup>1,2</sup>, Пыжова Н.С.<sup>1</sup>, Пыж А.Э.<sup>1</sup>

1. НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ, г. Минск, РФ.

2. Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, РБ.

*The original data set on the cleavage of proteins by extracellular proteinases of hospital strains of Pseudomonas aeruginosa, their phospholipase, hemolytic activities is stated. The hemolytic, phospholipase, proteolytic and protease-inhibitory properties of pyocyanin and pyoverdine are described for the first time.*

В условиях стационара одним из ведущих возбудителей гнойно-воспалительных и септических процессов является *Pseudomonas aeruginosa*. Несмотря на интенсивные исследования биологии и биохимии данного возбудителя, острота проблемы не снизилась. Этому способствует колоссальная устойчивость штаммов *P. aeruginosa* к целому ряду факторов внешней среды, неблагоприятная для других микроорганизмов. Важными факторами патогенности *P. aeruginosa* являются гемолизины, протеиназы и пигменты. Однако свойства их далеки от исчерпывающей ясности.

Изучены особенности внеклеточных протеиназ, гемолизина и сине-зеленых пигментов госпитальных штаммов *Pseud. aeruginosa* (любезно предоставлены сотрудниками лаборатории внутрибольничных инфекций ЦНИЛ Белгосмедуниверситета). Микроорганизмы культивировали в стандартных условиях на мясо-пептонном бульоне, бесклеточные супернатанты культуральной жидкости использовали для анализа.

Внеклеточные протеиназы необразующих слизь штаммов не расщепляли фибрин. Наиболее эффективно расщепляемым субстратом являлся, как правило, желатин, наиболее трудно расщепляемыми субстратами — гемоглобин и сывороточный альбумин. Судя по ингибиторному анализу, эти штаммы образуют несколько внеклеточных протеиназ разного типа, наиболее активны из них, по-видимо-

му, металлзависимые. Протеиназы госпитальных штаммов высоко чувствительны к ионам  $Hg^{2+}$  ( $10^{-3}M$ ), угнетающих на 65—100% расщепление всех белков, кроме желатина. Расщепление белков супернатантами культуральной жидкости слизееобразующих штаммов, как правило, менее чувствительно к ЭДТА, но существенно подавлялось диизопротилфторфосфатом. В ряде случаев обнаружена достаточно неожиданная картина: при высокой чувствительности к ЭДТА (полное подавление протеолитической активности при концентрации  $10^{-2}M$ ) нитротетразолиевый синий (NBT) вызывал угнетение не более, чем на 30%. Если же эффект ЭДТА не превышал 30—40%, NBT полностью блокировал расщепление белков. Обнаружены особенности расщепления различных белков внеклеточными протеиназами штаммов обеих групп [1].

Наибольшая фосфолипазная (лецитиназная) активность наблюдалась при культивировании микроорганизмов через 96 ч при 30 °С, а гемолитическая активность — при культивировании при 37 °С в течение трех суток. Перехватчики синглетного кислорода (азид, гистидин, триптофан), ОН-радикала (маннит и формиат) на 25—45% угнетали расщепление лецитина и лизис взвеси эритроцитов барана супернатантами бульонных культур. В присутствии перехватчика супероксидного радикала — NBT фосфолипазная активность подавлялась полностью, а гемолитическая — лишь на 24—45%. О-фенантролин, 8-оксихинолин, но не диэтилдитиокарбамат натрия (ДЭДТК), практически полностью подавляли фосфолипазную активность, а гемолитическую — до 50% лишь у 5 штаммов [2, 3]. В большинстве же случаев они усиливали гемолиз, что позволяет думать о важной роли в его проявлении активных форм кислорода, особенно супероксидного радикала (возможно, эндогенного характера), образующихся с участием металлов переменного валентности. Ранее сходная, хотя и не идентичная картина была описана нами для гемолитической активности стрептолизина О, который лишен фосфолипазной активности [4]. Подавление фосфолипазной (лецитиназной) активности перехватчиками активных форм кислорода, особенно NBT, описано нами впервые.

Кипячение супернатантов бульонных культур полностью инактивировало фосфолипазную активность, снижая гемолитическую на 15—60% у некоторых штаммов. На чашках с кровяным агаром у большинства штаммов до кипячения отмечался β-гемолиз из-за, скорее всего, действия фосфолипазы, но не гемолизина, ибо он очень чувствителен к сыворотке крови. Кипячение вело к полному уничтожению гемолитической активности лишь у 5 штаммов, у остальных сохранялось до 50% исходной гемолитической активности (терморезистентный гемолиз). Лишь маннит и формиат угнетали последний на 20—30%, остальные перехватчики и комплексоны усиливали его вдвое. Это ранее не описанный эффект, сущность которого требует проведения дальнейших исследований.

Более того, при образовании большого количества пигмента пиоцианина гемолитическая активность супернатантов бульонных культур *P. aeruginosa* резко возрастала. Такие супернатанты обладали чрезвычайно высокой гемолитической активностью: 0,2% или 0,6% взвесь эритроцитов барана лизировалась под действием 0,5 мл супернатанта в течение 3 мин, причем эта гемолитическая активность была терморезистентна [5]. После кипячения (30 мин) лишь у четырех штаммов из 11 она резко снизилась, а у четырех — заметно возросла. В литературе было известно о терморезистентной гемолитической субстанции псевдомонад, но предположения о ее природе разноречивы.

Супернатанты бульонных культур штаммов были подвергнуты гель-хроматографии на колонке  $10 \times 0,6$  см с сефадексом G-25, уравновешенной 0,15 M раствором NaCl. Элюицию вели этим же раствором. После удаления пигментов гемолитическая активность супернатантов бульонных культур не превышала 37% [5]. Полученные после хроматографии на сефадексе фракции пиоцианина обладали способностью расщеплять лецитин куриного яйца. Формиат натрия увеличивал эту способность фракции пиоцианина на 130%, а фракций пиовердина на 120—230%, ДЭДТК не влиял, а о-фенантролин и ЭДТА полностью ингибировали подобную лецитиназную активность. Гемолитическая активность фракций пигментов проявлялась только в присутствии ЭДТА и о-фенантролина (но не формиата или ДЭДТК), она полностью подавлялась NBT.

Учитывая способность пиоцианина генерировать активные формы кислорода и хелатирование пиовердином ионов железа, мы изучили влияние пигментной фракции на редукцию NBT в стандартной химической системе генерирования супероксидного ра-

дикала. Внесение в систему пигментной фракции в количестве 100 мкл вызвало снижение восстановления NBT синего на 31–56%. Следовательно, синие-зеленые пигменты способны не только генерировать супероксидный радикал, но и вызывать его трансформацию. Это обстоятельство побудило нас исследовать действие фракций пигментов на протеолитические реакции.

Для исключения возможных примесей собственных протеаз и иных белков микроорганизма фракции пигмента диализовали в течение 24 ч при температуре 4°C через целлофановую мембрану против деонизированной воды. Подвергнутые такой обработке образцы фракции синие-зеленого пигмента подавляли плазминогенактиваторную способность урокиназы на 55–67, а стрептокиназы — на 35–60%. Фракции пигментов существенно угнетали расщепление сывороточного альбумина  $\alpha$ -химотрипсином и папаином на 40–69%, трипсином, субтилизином и металлопротеиназой *Vas. megaterium* на 20–65%. Эффективность фракций пигментов отдельных штаммов в отношении различных протеиназ была неодинакова. Причины подобных различий требуют проведения дальнейших исследований. Возможно, они обусловлены наличием в составе пиовердина остатков аминокислот и олигопептидов, различающихся по длине цепи. В отдельных экспериментах нами зафиксировано, что фракции пиоцианина (в т.ч. полученная путем экстракции хлороформом) и пиовердина способны вызывать лизис белков в тонком слое агарового геля.

### Литература

1. Пыжова Н.С., Никандров В.Н. // Международная конф. «Протеолиз, механизмы его регуляции и роль в физиологии и патологии клетки. Тез. докл.». Минск, 2007. С. 63–65.
2. Пыж А.Э., Никандров В.Н. // Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства. Матер. VI междунар. научно-практ. конф. Витебск, 2007. С. 271–272.
3. Пыж А.Э., Никандров В.Н. // Труды Национального научно-исследовательского института медицинской профилактики Минздрава Республики Азербайджан. Баку, 2007, т. I. С. 196–202.
4. Никандров В.Н., Лапушкина Т.Н. // Бюлл. эксперимент. биол. мед. 1993. Т. 105, № 3. С. 277–278.
5. Никандров В.Н., Пыжова Н.С., Пыж А.Э. // Совершенствование осуществления государственного санитарного надзора в Республике Беларусь. Материалы XI съезда гигиенистов и эпидемиологов Республики Беларусь. Минск, 2007. С. 205–211.

## ОСОБЕННОСТИ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ КЛЕТКИ *CORYNEBACTERIUM DIPHTHERIAE*

Никандров В.Н.<sup>1,2</sup>, Пыжова Н.С.<sup>1</sup>

1. НИИ эпидемиологии и микробиологии МЗ РБ, г. Минск, РБ.
2. Институт физиологии НАН Беларуси, г. Минск, РБ

*The original results of own researches of the cleavage of protein substrates (fibrin(ogen), thrombin, casein, hemoglobin, gelatin, serum albumin) by extra- and intracellular proteinases of four reference toxigenic and non-toxicogenic strains of Corynebacterium diphtheriae and inhibitory analysis are presented. The features of proteolytic properties of purified samples of diphtheria toxin are described. The ability of PW-8 strain of production of protein substances with proteolysis effector properties is demonstrated.*

Дифтерия является тяжелым инфекционным заболеванием, однако свойства возбудителя дифтерии изучены далеко не полностью. Немногочисленные и фрагментарные данные литературы свидетельствуют о том, что клетки *Corynebacterium diphtheriae* имеют внутриклеточные и секретируемые протеиназы.

Методом лизиса фибриновых пластин, а также по лизису фибриногена, казеина, тромбина, гемоглобина, сывороточного альбумина или желатина в тонком слое агар-агара изучена активность протеиназ разрушенных клеток или бесклеточных супернатантов бульонных (Лингуда, Мартена) культур *Cor. diphtheriae*, шт. 4895, 10648, PW-8, BB-1–9.

**Внеклеточные протеиназы** [1]. Фибринолитическая, но не гемоглинолитическая активность супернатантов в первые сутки полностью исчезала или снижалась, что наводит на мысль о

секреции молодыми микробными популяциями ингибиторов отдельных протеиназ. Затем эта активность заметно нарастала с проявлением нескольких видов зависимости: максимум фибринолитической активности совпадал с наибольшим уровнем биомассы (шт. 4895); опережал максимум биомассы (шт. 10648 и PW-8), и, наконец, запаздывал за накоплением микробных клеток (шт. BB-1–9). Динамики фибринолитической и гемоглинолитической активностей не совпадали. Протеиназы супернатантов культуральной жидкости всех штаммов коринебактерий чувствительны к р-хлормеркурибензоату (PCMB) и о-фенантролину, на 42–100% подавлялись ЭДТА, но не всегда ингибировались этанолом (особенно шт. BB-1–9) и фенилметилсульфонилфторидом (PMSF). У шт. 4895 и 10648 PMSF вызвал даже проявление или резкое увеличение протеолитической активности [1]. Этот обнаруженный парадоксальный эффект нуждается в дальнейшем изучении.

**Внутриклеточные протеиназы.** Наиболее интенсивно они гидролизовали желатин, за исключением протеиназ шт. 10648, сильнее расщеплявших казеин. Фибрин же и тромбин интенсивно расщепляли только протеиназы высокотоксигенного шт. PW-8. Гидролиз тромбина протеиназами шт. 4895 отчетливо наблюдался, начиная лишь с 3-х суток роста культуры. Токсигенный шт. BB-1–9 не расщеплял и фибриноген [2].

В оптимальных для токсигенеза условиях протеиназы шт. PW-8 расщепляли белки, образуя ряд: желатин > фибриноген > тромбин = казеин > фибрин. При росте на бессывороточной среде Лингуда без отбора R-форм колоний ряд иной: казеин = тромбин > сывороточный альбумин > желатин = фибриноген, а в неоптимальных для токсигенеза условиях в присутствии сыворотки крови зависимость имела вид: фибриноген > сывороточный альбумин = казеин > желатин > тромбин [2]. В этих случаях фибрин не расщеплялся.

В оптимальных для токсигенеза условиях активность внутриклеточных протеиназ не угнеталась PMSF, за исключением шт. 4895 (подавление составило 37%), в ряде случаев лизис белков субстратов даже усиливался в 1,23–4,7 раз. При этом протеолиз сильно угнетался PCMB. Это очень характерно для штамма PW-8. Действие эффектора не проявлялось при расщеплении желатина шт. BB-1–9 и фибриногена шт. 10648. При утрате у колоний морфологических признаков токсигенности внутриклеточные протеиназы шт. PW-8 подавлялись как раз PMSF и были менее чувствительны к PCMB.

ЭДТА полностью подавлял лизис фибрина протеиназами шт. PW-8. В остальных случаях ингибирование не превышало 50%. О-фенантролин протеиназы PW-8 угнетал на 80–100%. В остальных же случаях его эффект не превышал 50% либо отсутствовал.

Перехватчики синглетного кислорода подавляли расщепление фибриногена, казеина, желатина на 21–57% либо не влияли на него. Исключением являлось полное подавление азидом желатинолитической активности протеиназ шт. PW-8R. Перехватчики NO-радикала не влияли на фибриногено(казеино)-литическую активность протеиназ штаммов, на 22–30% угнетая расщепление желатина. Специфический перехватчик O<sub>2</sub>-радикала — нитротетразолиевый синий (NBT) полностью блокировал гидролиз всех белков протеиназами обоих штаммов. Действие других перехватчиков — адреналина и супероксиддисмутазы зависело от расщепляемого белка: фибринолиз подавлялся полностью, а лизис остальных белков угнетался лишь на 20–40%. Весьма характерно для шт. PW-8 (но не для нетоксигенного 4895) полное подавление его протеолитической активности ароматическим соединением — HOQ.

**Протеолитическая активность токسينа.** Образцы дифтерийного токسينа шт. PW-8 (выделены методом солевого фракционирования и адсорбционной хроматографии, LD<sub>50</sub> на монослойных культурах фибробластов эмбрионов кур — 1,31 нг/мл, электрофоретическая гомогенность ≥ 95%) не расщепляли фибрин и не активировали прочно сорбированный на нем плазминоген. Они медленно активировали водорастворимый плазминоген, подавляя фибринолитическую активность химотрипсина, папаина [3]. Токсин практически не влиял на активаторные свойства стрептокиназы, тканевого активатора плазминогена, фактора роста нервов, а также на фибринолитическую активность пепсина [4]. В 0,01 М фосфатном буфере pH 7,4 образцы дифтерийного токسينа расщепляли фибриноген, желатин, сывороточный альбумин быка. Эта активность токسينа блокировалась добавками NBT (10<sup>-2</sup> М), но в отличие от внутриклеточных протеиназ, была мало чувствительна к адреналину, супероксиддисмутазе, перехватчи-